

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

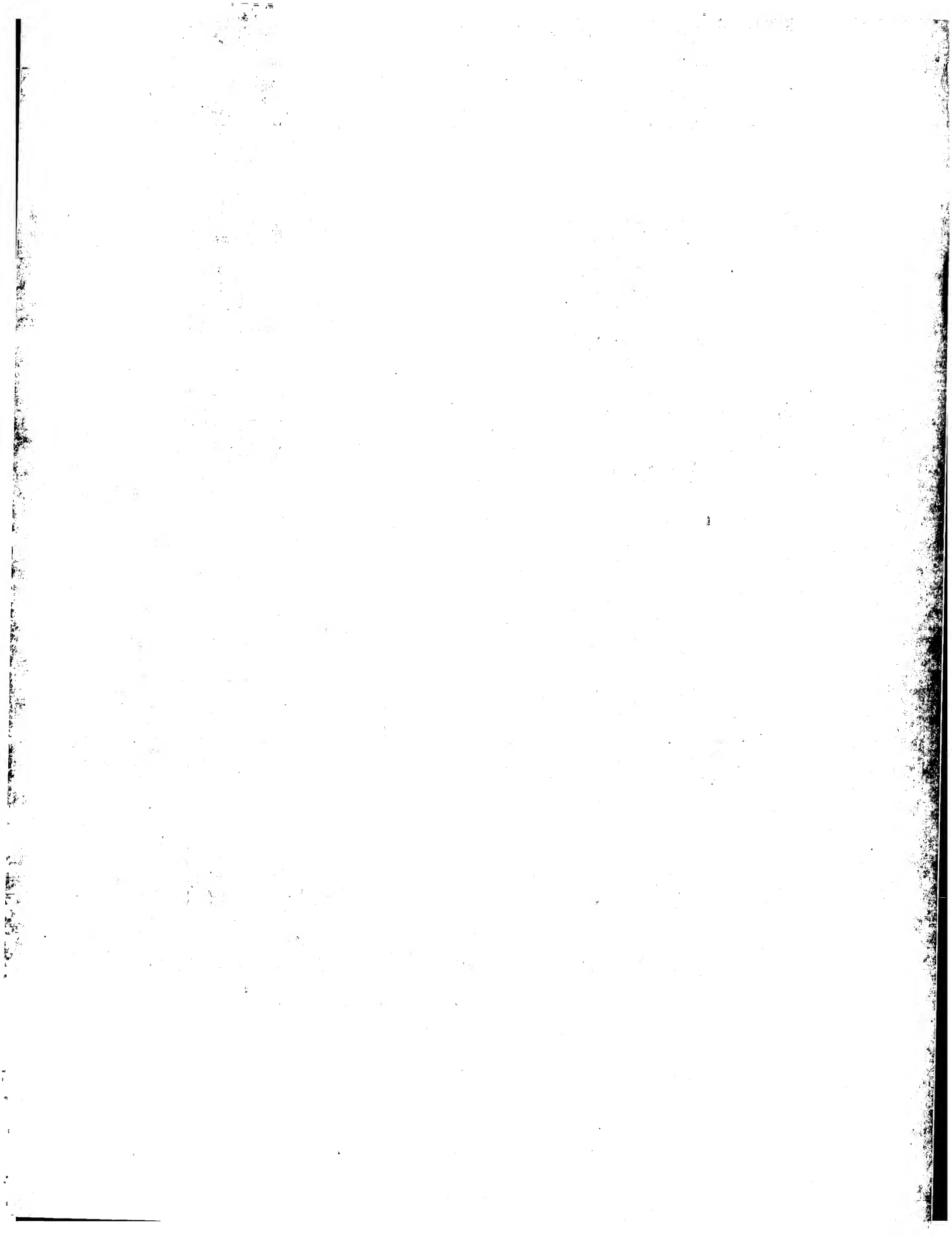
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





Docket 34076/US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Named Inventor: Michel Chateau	Examiner:  Group Art Unit:
Appln. No.: 10/781,499	
Filed: February 18, 2004	
Title: METHOD FOR THE PREPARATION OF AN EVOLVED MICROORGANISM FOR THE CREATION OR THE MODIFICATION OF METABOLIC PATHWAYS	

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

I hereby certify that this document is being deposited with the United States Postal Service via first class mail addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450, on this 30th day of March, 2004.

  
(Signature)

Sir:

Further to the claim for priority filed February 18, 2004 under the provisions of 35 USC § 119 for the above-identified U.S. Patent Application, submitted herewith are certified copies of the following French patent applications.

FR No. 0301924

Date: 18 Feb. 2003

FR No. 0305768

Date: 14 May 2003

FR No. 0305769

Date: 14 May 2003

FR No. 0313054

Date: 06 Nov. 2003

Respectfully submitted,

DORSEY & WHITNEY LLP

Date: March 30, 2004

By:   
Janet M. MacLeod (Reg. No. 35,263)  
DORSEY & WHITNEY LLP  
250 Park Avenue  
New York, NY 10177  
(212) 415-9200

Enclosures  
4827-7719-1168v1





# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 FEV. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)



100

100

100



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**cerfa**  
N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 210502

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>18 FEV 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0301924</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>18 FEV. 2003</b> PAR L'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 240129 D20701 BF			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date
		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	Date
		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Procédé de criblage et d'évolution dirigée de souches produisant de la méthionine par nouvelle voie métabolique			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		METABOLIC EXPLORER	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE	
	Code postal et ville	63360 SAINT BEAUZIRE, FRANCE	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

**BREVET D'INVENTION  
 CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
 page 2/2

**BR2**

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

**18 FEV 2003**

LIEU

**75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT

**0301924**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		240129 BF
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		<b>Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques</b>
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : <b>Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</b>
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		<b>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</b>
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		<b>Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt</b> <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): <b>AG</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 5px;">  </span>
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>  <b>L. MARIELLO</b>



La présente invention se rapporte au domaine de la bioconversion, et  
5 d'obtention d'acides aminés par fermentation de microorganismes. Elle se rapporte  
à une méthode de criblage et d'évolution dirigée permettant d'identifier une souche  
de microorganisme, éventuellement génétiquement modifié, possédant une enzyme  
cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase améliorées,  
ladite souche produisant de l'acide 2-Amino-4-(alkylmercapto)butyrique, en  
10 particulier de la L-méthionine (acide 2-Amino-4-(méthylmercapto)butyrique), par  
métabolisme d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan ou d'alkyl-  
mercaptide de sodium, en particulier de méthyl-mercaptan ou sodium-mercaptide.  
L'invention se rapporte également à cette souche de microorganisme.

Dans la suite, on considérera la seule terminologie alkyl-mercaptan pour  
15 désigner l'alkyl-mercaptan ou l'alkyl-mercaptide de sodium.

La DL-Méthionine est produite industriellement par synthèse chimique. Le  
méthyl-mercaptan réagit avec l'acroléine pour produire le  $\beta$ -méthyl  
thiopropionaldéhyde, qui réagit avec l'hydrogène cyanide pour produire l' $\alpha$ -  
20 hydroxy- $\gamma$ -méthyl-thio-butyro-nitrile. Après traitement avec l'ammoniac, et une  
hydrolyse, on obtient la méthionine.

Tous les producteurs industriels de la DL-méthionine utilisent les mêmes  
matières premières à savoir l'acroléine, le méthane thiol (méthyl-mercaptan),  
l'hydrogène cyanide et l'ammoniac ou l'ammonium carbonate. Le procédé de  
25 synthèse du mélange racémique peut être conduit en batch ou en continu.

Un procédé industriel combine à la synthèse chimique de la biocatalyse par  
l'utilisant l'amino acylase, enzyme produite par *Aspergillus oryzae* pour obtenir  
uniquement la L-méthionine à partir de la DL-méthionine.

Les brevets US 6,379,934 et EP 1 055 730 se rapportent à la production  
30 d'acides aminés en utilisant une souche de bactéries corynéformes, dans laquelle le  
gène *accBC* est amplifié. La méthionine est mentionnée, mais seule la préparation  
de L-lysine est exemplifiée.

Par contre, aucun procédé de bioconversion n'est utilisé de façon routinière en industrie alors que la plus grande partie des acides aminés (acide glutamique, lysine, thréonine...) sont produits industriellement par ce type de procédé.

En effet, le métabolisme de la méthionine, acide aminé soufré, est fortement  
5 régulé et cette régulation ne permet pas l'obtention de rendements susceptibles de concurrencer les rendements obtenus par synthèse organique. La régulation du métabolisme de la méthionine se fait à plusieurs niveaux (Weissbach et al., 1991, Mol. Microbiol., 5, 1593-1597) :

- 10 - métabolisme carboné pour la fabrication de la L-sérine à partir du glycerate3P, de la L-homosérine à partir de l'aspartate et de l'acétyl-CoA
- métabolisme du soufre pour la fabrication de la L-cystéine à partir de la L-sérine, de l'acétyl-CoA et du sulfate du milieu de culture
- 15 - synthèse de la méthionine (Fig. 1) à partir de la L-homosérine, de la cystéine et d'acétyl-CoA ou succinyl-CoA.

La présente invention se rapporte à des souches de microorganismes en particulier des bactéries, notamment E. coli et les corynébactéries, produisant  
20 l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, en particulier de la L-méthionine, par métabolisme d'une source de carbone simple et d'alkylmercaptan. De préférence l'alkylmercaptan est constitué de 1 à 18 atomes de carbones, en particulier de 1 à 4 atomes, et on utilisera préférentiellement du méthylmercaptan. Les souches de microorganismes selon l'invention possèdent une enzyme cystathionine-γ-synthase  
25 et/ou l'acylhomoserine sulphydrylase ; elles sont de préférence sélectionnées et améliorées par un procédé de criblage et d'évolution, qui est aussi un objet de l'invention. Les souches selon l'invention peuvent également être génétiquement modifiées (c'est-à-dire présenter une inactivation, une mutation et/ou la suractivation d'au moins un gène endogène), la modification étant effectuée  
30 préalablement ou non à la mise en œuvre du procédé de criblage.

Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier. On entend désigner notamment

les différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose.

5

L'utilisation d'une source de carbone simple et du méthyl-mercaptan pour la production de méthionine par bioconversion présente *a priori* plusieurs avantages, notamment :

10

- la synthèse de la méthionine devient indépendante de la synthèse de la cystéine, ainsi que du cycle du tétrahydrofolate.
- une matière première toxique issue de la pétrochimie est valorisée par la biosynthèse d'un acide aminé à valeur ajoutée par un procédé biotechnologique.
- la méthionine est synthétisée en une unique étape à partir de l'O-succinyl-L-homosérine (ou de l'O-acétyl-L-homosérine) et du méthyl-mercaptan (ou méthyl-mercaptide de sodium) sachant que de façon naturelle cette biosynthèse met en jeux 3 réactions enzymatiques (Fig. 1 et 2).

15

20 L'invention est basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une amélioration de l'activité « méthionine-synthase » de la cystationine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9 ; GenBank AAN83320) en présence de méthyl-mercaptan. Cette enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, codée par le gène *metB* chez *E. coli* (Fig. 2.A) et *C. glutamicum* (Fig. 2.B), présente une activité pour un large spectre de  
25 substrats.

L'invention est aussi basée sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une amélioration de l'activité « méthionine-synthase » de l'O-acétyl-L-homosérine sulphydrolase (ou O-acétyl-L-homosérine sulphydrylase, C 4.2.99.10) en présence de méthylmercaptan. Cette enzyme (Fig. 2.C) de la voie de biosynthèse de  
30 méthionine, codée par le gène *metY* (*metZ*) chez *C. glutamicum* (Genbank AF220150), présente une activité pour un large spectre de substrats.

Dans la suite de ce document, on utilisera la notion « d'activité méthionine-synthase » pour désigner plus largement l'activité qui permet l'obtention d'acide 2-

amino-4-(alkylmercapto)butyrique, en particulier de la L-méthionine, à partir d'O-acyl-L-homosérine et d'alkyl mercaptan.

Dans un mode particulier et préféré, on produit la L-méthionine à partir d'O-acyl-L-homosérine et de méthylmercaptan. Dans ce mode particulier l'O-acyl-L-homosérine est l'O-acétyl-L-homosérine ou l'O-succinyl-L-homosérine.

Une activité « méthionine synthase » est améliorée dans la souche (A) de microorganisme par rapport à la souche (I) initiale lorsque la production de méthionine dans les mêmes conditions de culture (dans un milieu contenant une quantité efficace de méthylmercaptan ou méthylmercaptide de sodium) est supérieure pour la souche (A) que pour la souche (I). Cette amélioration est préférentiellement observée par étude de la quantité de méthionine produite. Dans certains cas, on peut observer cette amélioration par l'augmentation du taux de croissance de la bactérie (A) par rapport au taux de croissance de la bactérie (I), dans un milieu minimum ne contenant pas de méthionine.

Afin d'accélérer la sélection et l'évolution dirigée des souches pour la production de méthionine en présence de méthylmercaptan on peut :

a. Coupler la biosynthèse de la molécule d'intérêt à la croissance du microorganisme de telle sorte que la production de cette molécule est nécessaire pour une bonne croissance du microorganisme

Pour cette raison on peut faire le choix de détruire le gène *metE* codant la méthionine-synthase qui produit la méthionine à partir d'homocystéine. Ce faisant la souche devient auxotrophe pour la méthionine.

Le microorganisme, pour vivre en milieu minimum contenant une source de carbone simple et du méthylmercaptan ou méthylmercaptide de sodium, doit donc optimiser la voie de synthèse de la L-méthionine à partir de l'O-acyl-L-homosérine et du méthylmercaptan ou méthylmercaptide de sodium. Une modélisation informatique montre que dans ces conditions il est possible de doubler les rendements théoriques en méthionine (Tableau 1).

Rendements biomasse $Y_{X/S} (g \cdot g^{-1})$	Rendements méthionine <sup>a</sup> $Y_{P/S} (g \cdot g^{-1})$	Rendements méthionine <sup>b</sup> $Y_{P/S} (g \cdot g^{-1})$
0	0,36	0,74
0,11	0,30	0,62
0,28	0,21	0,42
0,44	0,12	0,24
0,61	0	0

**Tableau 1** : rendements théoriques maximums pour la production de méthionine (g de produit/g de glucose) par *E. coli* dans le cas d'une fermentation sur glucose (a) et d'une fermentation sur glucose et méthyl-mercaptan (b) avec un rendement en biomasse constant (cultures continues).

5           Cependant, lorsque l'on souhaite produire un acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique différent de la L-méthionine, il est nécessaire de compléter le milieu en méthionine pour permettre la croissance du microorganisme.

10           **b. Supprimer les régulations, notamment les rétro-inhibitions soit au niveau des enzymes, soit au niveau des gènes afin que la voie de biosynthèse principale soit potentialisée**

On peut ainsi supprimer le gène *metJ* codant une protéine répresseur. Par ailleurs, il a été montré que l'homosérine trans-succinylase, codée par le gène *metA*,  
15           était rétro-inhibée par la méthionine et la S-adenosylméthionine (Taylor et al., 1966, J. Biol. Chem., 241 : 3641-3642). Il est donc souhaitable de remplacer cette enzyme par une enzyme insensible à la rétro-inhibition (Chater et al, 1970, J. Gen. Microbiol. 63: 121-131).

20           Un objet de l'invention est donc un microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, par métabolisme d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et présentant une mutation dans une enzyme induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, par rapport au microorganisme ne présentant pas ladite mutation.

25           Un objet de l'invention est donc un microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, par métabolisme d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et présentant une mutation dans l'enzyme

cystathionine  $\gamma$ -synthase induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, par rapport au microorganisme ne présentant pas ladite mutation.

Un autre objet de l'invention est un microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, par métabolisme d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et présentant une mutation dans l'enzyme O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, par rapport au microorganisme ne présentant pas ladite mutation.

De préférence, l'alkyl-mercaptan est le méthyl-mercaptan ou sodium-mercaptide et l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique est la L-méthionine.

Dans un cas particulier, ledit microorganisme est obtenu par criblage et sélection à partir d'une souche initiale, éventuellement génétiquement modifiée, permettant d'obtenir une évolution forcée de l'enzyme considérée pour augmenter son activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan.

Un autre objet de l'invention est un test de criblage-identification permettant d'obtenir un microorganisme produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, notamment la L-méthionine, en métabolisant un alkyl-mercaptan, notamment le méthyl-mercaptan.

Ainsi, la présente invention permet d'identifier des souches présentant des mutations dans leur génome, lesdites mutations permettant l'assimilation d'un alkyl-mercaptan par ladite souche, et la production dudit acide. Lesdites modifications induisent donc une augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite souche. On peut alors accélérer la production de la souche produisant de la méthionine de façon autonome à partir d'une source de carbone simple et de méthyl-mercaptan.

Un premier objet de l'invention est donc un procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale, éventuellement génétiquement modifiée, possédant une enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant de la L-méthionine, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase, induisant une

augmentation de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, présentant l'étape consistant à :

- soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence d'alkyl-mercaptan, afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase, dans ladite souche bactérienne,

ladite souche bactérienne initiale présentant éventuellement une inactivation et/ou une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif, d'au moins un gène endogène.

- 10 Dans un autre mode de réalisation, l'invention se rapporte à un procédé de criblage d'une souche bactérienne initiale, éventuellement génétiquement modifiée, possédant une enzyme O-acétyl-L-homosérine sulphydrolase, en vue d'obtenir une souche bactérienne génétiquement modifiée produisant de la L-méthionine, et présentant une modification dans le gène de ladite enzyme O-acétyl-L-homosérine sulphydrolase, induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » en
- 15 présence d'alkyl-mercaptan, présentant l'étape consistant à :

- soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence d'alkyl-mercaptan, afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase, dans ladite souche bactérienne,

ladite souche bactérienne présentant éventuellement une inactivation et/ou une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif, d'au moins un gène endogène.

- 25 L'homme du métier connaît des promoteurs forts constitutifs chez les microorganismes. De préférence, le promoteur fort constitutif est choisi parmi pTAC-O (SEQ ID N° 1), pLAC-O (SEQ ID N° 2), pTRC-O (SEQ ID N° 3), pTHLA (SEQ ID N° 4), promoteurs forts pour lesquels l'opérateur lac a été délété pour les rendre constitutifs.

- 30 Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche bactérienne comprend une inactivation d'au moins un gène endogène choisi parmi *metJ*, *metC*, *metE*, *metH*.

Dans un mode de réalisation, l'inactivation concerne le gène *metJ*.

Dans un mode de réalisation, l'inactivation concerne le gène *metC*.

Dans un mode de réalisation, l'inactivation concerne le gène *metE*.

Dans un mode de réalisation, l'inactivation concerne le gène *metH*.

Une mutation du gène *metJ* a été proposée dans JP 2000157267-A/3, pour produire une quantité supérieure de méthionine (voir aussi GenBank E35587). Ce  
5 gène code pour une protéine de répression des gènes *met B*, *E*, *L*, *J* et *R* (chez *Salmonella typhimurium*). Son inactivation ou sa modification permet de diminuer le rétrocontrôle par la méthionine.

Le gène *metC* (GenBank M12858), code pour la cystathionine- $\beta$ -lyase (EC 4.4.1.8), les gènes *metE* (GenBank AE000458) et *metH* (GenBank J04975) codent  
10 pour la méthionine synthase (EC 2.1.1.13). La méthionine est un acide aminé essentiel à la vie cellulaire. L'inactivation d'un ou plusieurs de ces gènes revient à supprimer la voie habituelle de biosynthèse de la méthionine.

Ceci permet de sélectionner les souches qui ont développé le métabolisme du méthyl-mercaptan pour la production de méthionine. Il est à noter que l'on  
15 obtient alors des souches auxotrophes pour la méthionine, qui survivent en raison de leur possibilité à produire cet acide aminé par une voie alternative. Il est donc important, dans le test de criblage selon l'invention que de la méthionine soit présente initialement dans le milieu de culture, afin de permettre une première croissance des microorganismes.

20 En utilisant les références données sur GenBank pour ces gènes qui sont bien connus, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées du fait de la synthèse de ces gènes pour d'autres microorganismes, et  
25 en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

30 Dans un mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre également une modification de l'activité homosérine O-acyltransférase porté par le gène *metA* afin de lui conférer au choix une activité homosérine O-succinyltransférase (EC 2.3.1.46) ou homosérine O-acétyltransférase (EC 2.3.1.11).



Dans un mode particulier, on pourra remplacer ou modifier le gène *metA* de *E. coli*, codant l'enzyme possédant l'activité homosérine O-succinyltransférase (Genbank AAN83396), afin d'obtenir une activité homosérine O-acétyltransférase. Il est connu de l'homme du métier que cette activité est codée par le gène *metA* de  
5 *C. glutamicum* (Genbank AF052652). Les protocoles permettant de remplacer le gène *metA* de *E. coli* par le gène *metA* de *C. glutamicum*, ou de modifier la séquence de *metA* de *E. coli* afin d'obtenir une activité homosérine O-acétyltransférase au lieu d'une activité homosérine O-succinyltransférase sont connus de l'homme du métier.

10 De manière similaire on peut remplacer ou modifier le gène *metA* de *C. glutamicum*, codant une activité homosérine O-acétyltransférase, afin d'obtenir une activité homosérine O-succinyltransférase.

Toutes les modifications mentionnées ci-dessus peuvent être effectuées  
15 directement sur la souche objet de la pression de sélection, lorsque le procédé selon l'invention est mis en œuvre. Alternativement, il est préférable de mettre en œuvre le procédé de criblage selon l'invention sur une souche ne présentant qu'un nombre restreint de modifications, d'obtenir une souche présentant une activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, en particulier de méthyl-  
20 mercaptan, et d'effectuer alors d'autres modifications telles que mentionnées, afin d'augmenter le 'bypass' de la voie classique de synthèse de la méthionine.

L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique de microorganismes. La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou  
25 inductible. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide répliquatif (simple ou multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison homologue. Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans  
30 la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subi un

événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections  
5 positive et négative; afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaison.

Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche bactérienne est une souche d'*E. coli*.

Dans un autre mode de réalisation, ladite souche bactérienne est une souche  
10 de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.

L'invention se rapporte également à une souche bactérienne présentant une modification dans le gène de l'enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou dans le gène de l'enzyme O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, induisant une augmentation de  
15 l'activité « méthionine synthase » de ladite enzyme en présence d'alkyl-mercaptan, en particulier de méthyl-mercaptan. Une telle souche peut également présenter au moins une autre modification génétique, (inactivation, mutation ou surexpression d'un gène endogène), telle que mentionnée ci-dessus.

La souche selon l'invention est de préférence susceptible d'être obtenue par  
20 un procédé selon l'invention, et en particulier est obtenue par le procédé selon l'invention.

L'invention se rapporte plus particulièrement à l'utilisation d'une souche bactérienne selon l'invention, et notamment obtenue par un procédé de sélection selon l'invention, dans un procédé de préparation d'acide 2-amino-4-  
25 (alkylmercapto)butyrique, ledit procédé comprenant les étapes de fermentation de ladite souche bactérienne en présence d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et de récupération de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique produit, ladite souche présentant une mutation dans le gène de la cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou de l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, induisant une augmentation  
30 de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan. De préférence, ladite souche présente une autre modification génétique, (inactivation ou surexpression d'un gène endogène), telle que mentionnée ci-dessus.

De préférence, le procédé permet de préparer la méthionine, et la souche est fermentée en présence de méthyl-mercaptan.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'une souche bactérienne présentant une modification dans le gène de la cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou de  
5 l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, ladite modification étant identifiée dans une souche obtenue par un procédé selon l'invention, dans un procédé de préparation d'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, ledit procédé comprenant les étapes de fermentation de ladite souche bactérienne en présence  
10 d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et de récupération de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique produit.

De préférence, on produit de la méthionine, en fermentant en présence de méthyl-mercaptan.

15 L'invention se rapporte également à un procédé de préparation d'un acide 2-amino-4(alkylmercapto)butyrique, utilisant une souche selon l'invention, ou une souche présentant une mutation dans le gène de la cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou de l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, induisant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » de ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou O-acyl-L-  
20 homosérine sulfhydrolase en présence d'alkyl-mercaptan, ladite modification étant identifiée dans une souche obtenue par un procédé selon l'invention, ledit procédé comprenant les étapes de fermentation de ladite souche en présence d'alkyl-mercaptan et d'une source de carbone simple, et de récupération de l'acide ainsi produit. De préférence, ledit acide est la méthionine, et ledit alkyl-mercaptan est le  
25 méthyl-mercaptan.

La définition des conditions de fermentation est du ressort de l'homme du métier. On fermente notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

30 La fermentation est conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries utilisées, contenant au moins une source de carbone simple ainsi que de l'alkyl-mercaptan.

En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and  
 5 Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96), les milieux pouvant être supplémentés pour compenser les auxotrophies, notamment l'éventuelle auxotrophie initiale à la méthionine.

De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum*  
 10 pourra ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583). Les milieux contiennent une concentration en carbone simple jusqu'à 30 g/l, plus particulièrement entre 5 et 20 g/l, ainsi que de l'alkyl-mercaptan jusqu'à 590 mM,  
 15 plus particulièrement entre 5 et 40 mM.

### DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : synthèse de la méthionine à partir de l'homosérine, chez les bactéries.

Figure 2 : stratégies envisagées pour obtenir une synthèse de méthionine à partir de  
 20 méthyl-mercaptan et de O-succinyl-L-homosérine (A) ou d'O-acétyl-homosérine (B, C). Les réactions représentées par les flèches à gauche de la figure représentent les réactions métaboliques classiquement trouvées chez *E. coli* (A) ou chez *C. glutamicum* (B, C) permettant la synthèse de la méthionine en trois étapes à partir de la O-succinyl-L-homosérine (A) ou d'O-acétyl-homosérine (B, C). Les flèches  
 25 épaisses à droite représentent la stratégie selon l'invention, dans laquelle la méthionine est produite en une étape à partir de la O-succinyl-L-homosérine (A) ou d'O-acétylhomoserine (B, C) en co-utilisation avec du méthyl-mercaptan. La réaction nécessite l'activité « méthionine synthase » de la cystathionine-γ-synthase (A, B), ou l'activité « méthionine synthase » de l'acétylhomosérine sulfhydrylase  
 30 (C). Le détail de la réaction catalysé par *metA* est donné dans la Figure 1. La molécule de cystathionine apparaît en traits légers dans la figure C, pour mieux appréhender la différence de cette stratégie avec A ou B.

Figure 3 : représentation d'un mécanisme de fermentation continue pour la sélection dirigée des souches selon l'invention.

Figure 4 : Comparaison de spectres de  $^{13}\text{C}$ -RMN, correspondant au carbone 5 de la méthionine, obtenus par HSQC sur un hydrolysate de la souche sauvage (haut) ou de la souche K1a-F optimisée (bas). On observe que le carbone 5 de la souche K1a-F n'est pas marqué au carbone 13 ce qui confirme qu'il provient du méthylmercaptide de sodium

## EXEMPLES

### Exemple 1

10 Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthylmercaptan, on effectue une sélection dirigée en flacons.

La souche *E. coli* K12 est préalablement rendue auxotrophe pour la méthionine en inactivant le gène *metE*, et ne peut donc croître qu'en fabriquant sa propre méthionine, par l'utilisation du méthyl-mercaptan.

15 La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont une enzyme, et très probablement la cystathionine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » améliorée en présence de méthyl-mercaptan.

La sélection dirigée est conduite en flacon en verre hermétiquement fermé  
20 contenant 50 mL de milieu minéral (Schaefer et al., 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) en présence de 33 mM glucose, et du chloramphénicol à une concentration finale de 25 mg/l.

Les milieux de culture sontensemencés avec la souche *E. coli* K12  $\Delta metE$  à  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  définie. On ensemence avec une population de bactéries suffisamment  
25 importante pour que certaines bactéries possèdent potentiellement des mutations spontanées intéressantes dans le gène *metB*, permettant d'assimiler le méthyl-mercaptan. Cette population a été obtenue par culture de la souche auxotrophe en méthionine sur milieu minimum supplémenté en méthionine.

Trois flacons reçoivent alors 100  $\mu\text{L}$  d'une solution à 400 mg/L de sodium mercaptide, tandis qu'un quatrième flacon ne reçoit pas de sodium mercaptide. Les  
30 cultures sont réalisées sous agitation, à 37°C, pendant 6 jours, puis la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  est mesurée. Les résultats sont résumés dans le tableau N°3.

	Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon Témoin
DO <sub>600nm</sub> à T=0	0.34	0.34	0.34	0.34
DO <sub>600nm</sub> à T=6 jours	0.23	1.14	0.79	0.32

Tableau 3. Mesure de la densité optique de milieux de cultures pour *E. coli* en présence (flacons 1-3) ou absence (flacon témoin) de sodium mercaptide.

5 Ces résultats montrent que les flacons 2 et 3 ont permis de multiplier une souche capable d'utiliser le méthyl-mercaptan pour produire la méthionine nécessaire à sa croissance (augmentation de la densité optique).

Il est probable que l'activité « méthionine synthase » améliorée observée provienne d'une modification dans le gène de la cystathionine  $\gamma$ -synthase de la souche *E. coli* K12  $\Delta metE$ , contenue dans les flacons 2 et 3.

10 La population bactérienne du Flacon 2 peut alors être utilisée pour améliorer davantage l'activité « méthionine synthase » en présence de méthyl-mercaptan, en utilisant un procédé de criblage et amélioration par fermentation en étage (exemple 2), ou en recommençant le procédé en flacon tel qu'il vient d'être décrit.

## 15 Exemple 2

Pour optimiser *E. coli* pour la production de méthionine à partir du méthyl-mercaptan, on effectue une sélection.

20 La souche *E. coli* K12 est préalablement rendue auxotrophe pour la méthionine en inactivant le gène *metE*, et ne peut donc croître qu'en fabriquant sa propre méthionine, par l'utilisation du méthyl-mercaptan.

La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont une enzyme, et très probablement la cystathionine- $\gamma$ -synthase (EC 4.2.99.9) a développé une activité « méthionine-synthase » améliorée en présence de méthyl-mercaptan.

25 Alternativement, on peut utiliser une souche obtenue selon l'exemple 1.

La sélection dirigée est conduite dans un système en continu en étage (Figure 3).

Le premier fermenteur produit les bactéries à une vitesse proche du taux de croissance maximum. Les bactéries passent en continu de ce fermenteur dans un

second fermenteur caractérisé par un taux de dilution plus faible et un milieu avec le crible de sélection (ici, le méthyl-mercaptan).

La pression de sélection, imposée à la bactérie dans le second fermenteur, est établie par la concentration en méthyl-mercaptan. Des cycles successifs de  
5 sélection permettent d'appliquer aux bactéries des cribles de plus en plus fort par des concentrations croissantes en méthyl-mercaptan.

Pour chaque concentration, la souche sélectionnée dans le second fermenteur est celle qui a évolué pour métaboliser la totalité du méthyl-mercaptan (méthyl-mercaptan résiduel nul dans le fermenteur).

10 Dans ce cas, on recommence la sélection en utilisant le fermenteur n°2 comme fermenteur de croissance et le fermenteur n°1 comme fermenteur de crible, présentant du méthyl-mercaptan de concentration plus forte qu'à l'étape précédente.

On effectue différents cycles de sélection pour obtenir une souche fermentant le méthyl-mercaptan avec une vitesse élevée. L'analyse de cette souche  
15 permet de définir les mutations dans le gène de la cystathionine- $\gamma$ -synthase.

### Exemple 3

La population d'*E. coli* K12  $\Delta$ metE issue du flacon 2 de l'exemple 1 a subi des repiquages successifs en flacon. La nouvelle population obtenue K1a-F est mise  
20 en culture dans un milieu minimum (Schaefer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) contenant 2,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose entièrement marqué au carbone 13 et du méthylmercaptide de sodium (200 ppm) non enrichi en carbone 13. Cette population est auxotrophe pour la méthionine en l'absence de méthylmercaptide de sodium.

25 Après la culture, les cellules sont récupérées, lavées puis hydrolysées par HCl 6N pendant 24 heures à 107°C. Une analyse par RMN bidimensionnelle est alors réalisée (HSQC). Cette analyse permet d'étudier le carbone 5 de la méthionine, qui provient, soit de la L-cystéine, produite à partir du glucose présent dans la solution (voie classique), soit du méthylmercaptide de sodium lorsque la  
30 nouvelle voie métabolique selon l'invention est utilisée.

L'expérience est conduite de manière similaire avec la souche sauvage *E. coli* K12 (produisant la méthionine à partir du glucose), en absence de méthylmercaptide de sodium.

La figure 4 montre deux spectres 1D, issus de deux acquisitions distinctes, superposés pour une meilleure lecture. Ces spectres 1D sont extraits de spectres RMN à deux dimension type HSQC (corrélation entre protons et carbone 13). Les spectres RMN à deux dimensions ont été obtenu sur un hydrolysats acide des bactéries.

L'échantillon analysé est un hydrolysats total ; cependant du fait de la sensibilité de la RMN et des temps d'acquisition utilisés, on détecte essentiellement les acides aminés, les sucres, les bases et le glycérol. Chaque carbone (couplé à un proton) de chaque acide aminé donne une résonance magnétique nucléaire.

10 Le carbone 5 de la méthionine (c'est à dire le groupe méthyl terminal) présente un déplacement chimique d'environ 14,7 ppm. La figure 4 présente la zone de déplacement chimique centrée autour de 14,7 ppm pour les deux souches.

On remarque que dans le cas du spectre supérieur, le signal du carbone 5 est fort, indiquant que le carbone 5 est marqué au carbone 13. En conséquence, ce  
15 carbone 5 provient du glucose marqué introduit comme substrat dans le milieu de culture.

On remarque par contre que le même signal est très faible dans le spectre inférieur (souche K1a-F). Cela signifie que le carbone 5 n'est pratiquement pas marqué. Pourtant les autres carbones de la molécule sont fortement marqués  
20 (résultats non présentés). Le carbone 5 non marqué ne provient donc pas du glucose mais du méthyl-mercaptan.

On peut donc conclure que la souche K1a-F produit de la méthionine à partir de succinyl-L-homosérine et de méthylmercaptide de sodium.



### Revendications

1. Procédé d'obtention, à partir d'une souche bactérienne initiale, d'une souche bactérienne génétiquement modifiée présentant une modification dans un gène  
5 codant pour une enzyme, présentant une activité « méthionine synthase » améliorée par rapport à ladite souche bactérienne initiale, ladite souche bactérienne génétiquement modifiée produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique en présence d'alkyl-mercaptan, ledit procédé présentant l'étape consistant à :
  - 10 - soumettre ladite souche bactérienne à une pression de sélection en présence d'alkyl-mercaptan, afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme cystathionine- $\gamma$ -synthase, dans ladite souche bactérienne, vers un gène à activité « méthionine synthase » améliorée.
- 15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit gène codant pour une enzyme est le gène codant pour la cystathionine- $\gamma$ -synthase ou l' O-acyl-L-homosérine sulphydrolase
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale présente au moins une modification génétique d'au  
20 moins un gène endogène choisie dans le groupe constitué d'une inactivation, une mutation et une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale comprend une disruption d'au moins un gène endogène  
25 choisi parmi *metJ*, *metC*, *metE*, *metH*.
5. Procédé selon l'une des revendications 3 à 4, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale présente une modification du gène *metA*, lui conférant une activité acyltransférase différente de l'activité acyltransférase originelle.
- 30 6. Procédé selon l'une des revendications 3 à 4, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale comprend une surexpression du produit du gène *metA*.

### Revendications

1. Procédé d'obtention, à partir d'une souche bactérienne initiale, d'une souche bactérienne génétiquement modifiée présentant une modification dans un gène codant pour une enzyme, présentant une activité « méthionine synthase » améliorée par rapport à ladite souche bactérienne initiale, ladite souche bactérienne génétiquement modifiée produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique en présence d'alkyl-mercaptan, ledit procédé présentant l'étape consistant à :
  - 10                    -            soumettre ladite souche bactérienne initiale à une pression de sélection en présence d'alkyl-mercaptan, afin de diriger une évolution du gène codant pour la cystathionine- $\gamma$ -synthase ou l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, dans ladite souche bactérienne, vers un gène à activité « méthionine synthase » améliorée.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale présente au moins une modification génétique d'au moins un gène endogène choisie dans le groupe constitué d'une inactivation, une mutation et une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif.
- 20                    3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale comprend une disruption d'au moins un gène endogène choisi parmi *metJ*, *metC*, *metE*, *metH*.
4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale présente une modification du gène *metA*, lui conférant une activité acyltransférase différente de l'activité acyltransférase originelle.
- 25                    5. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale comprend une surexpression du produit du gène *metA*.
- 30                    6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale est une souche d'*E. coli*.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale est une souche d'*E. coli*.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale est une souche de *Corynebacterium*, en particulier  
5 *C. glutamicum*.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique est la L-méthionine, et que ledit alkyl-mercaptan est le méthyl-mercaptan.
10. Souche bactérienne obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à  
10 9.
11. Souche bactérienne susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 9, présentant une modification génétique dans une enzyme, notamment la cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou l'O-acyl-L-homosérine  
15 synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, par rapport à une souche pour laquelle ladite enzyme n'est pas modifiée.
12. Souche bactérienne présentant une modification génétique dans une enzyme, notamment la cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou l'O-acyl-L-homosérine  
20 synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, par rapport à une souche pour laquelle ladite enzyme n'est pas modifiée..
13. Souche bactérienne selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce qu'elle présente en outre au moins une autre modification génétique d'au moins  
25 un gène endogène choisie dans le groupe constitué d'une inactivation, une mutation et une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif.
14. Utilisation d'une souche bactérienne selon l'une des revendications 10 à 13, dans un procédé de préparation d'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, comprenant les étapes de fermentation de ladite souche bactérienne en présence  
30 d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et de récupération de l'acide produit.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit acide  
5 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique est la L-méthionine, et que ledit alkyl-mercaptan est le méthyl-mercaptan.
9. Souche bactérienne obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8.
10. Souche bactérienne susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des  
10 revendications 1 à 8, présentant une modification génétique dans une enzyme, notamment la cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, présentant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, par rapport à une souche pour laquelle ladite enzyme n'est pas modifiée.
- 15 11. Souche bactérienne selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle présente en outre au moins une autre modification génétique d'au moins un gène endogène choisie dans le groupe constitué d'une inactivation, une mutation et une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif.
- 20 12. Utilisation d'une souche bactérienne selon l'une des revendications 9 à 11, dans un procédé de préparation d'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, comprenant les étapes de fermentation de ladite souche bactérienne en présence d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et de récupération de l'acide produit.
- 25 13. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique est la L-méthionine, et que ledit alkyl-mercaptan est le méthyl-mercaptan.
14. Utilisation selon la revendication 12 ou 13, caractérisée en ce que ladite source  
30 de carbone simple est choisie dans le groupe constitué du glucose et du saccharose.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ladite souche bactérienne initiale est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit acide  
5 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique est la L-méthionine, et que ledit alkyl-mercaptan est le méthyl-mercaptan.
9. Souche bactérienne obtenue par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8.
10. Souche bactérienne susceptible d'être obtenue par un procédé selon l'une des  
10 revendications 1 à 8, présentant une modification génétique dans une enzyme, notamment la cystathionine- $\gamma$ -synthase et/ou l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, présentant une augmentation de l'activité « méthionine synthase » en présence d'alkyl-mercaptan, par rapport à une souche pour laquelle ladite enzyme n'est pas modifiée.
- 15 11. Souche bactérienne selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle présente en outre au moins une autre modification génétique d'au moins un gène endogène choisie dans le groupe constitué d'une inactivation, une mutation et une suractivation, notamment par insertion d'un promoteur fort constitutif.
- 20 12. Utilisation d'une souche bactérienne selon l'une des revendications 9 à 11, dans un procédé de préparation d'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique, comprenant les étapes de fermentation de ladite souche bactérienne en présence d'une source de carbone simple et d'alkyl-mercaptan, et de récupération de l'acide produit.
- 25 13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique est la L-méthionine, et que ledit alkyl-mercaptan est le méthyl-mercaptan.
14. Utilisation selon la revendication 12 ou 13, caractérisée en ce que ladite source  
30 de carbone simple est choisie dans le groupe constitué du glucose et du saccharose.

15. Utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit acide 2-amino-4-(alkylmercapto)butyrique est la L-méthionine, et que ledit alkyl-mercaptan est le méthyl-mercaptan.
16. Utilisation selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que ladite source  
5 de carbone simple est choisie dans le groupe constitué du glucose et du saccharose.

1 / 6

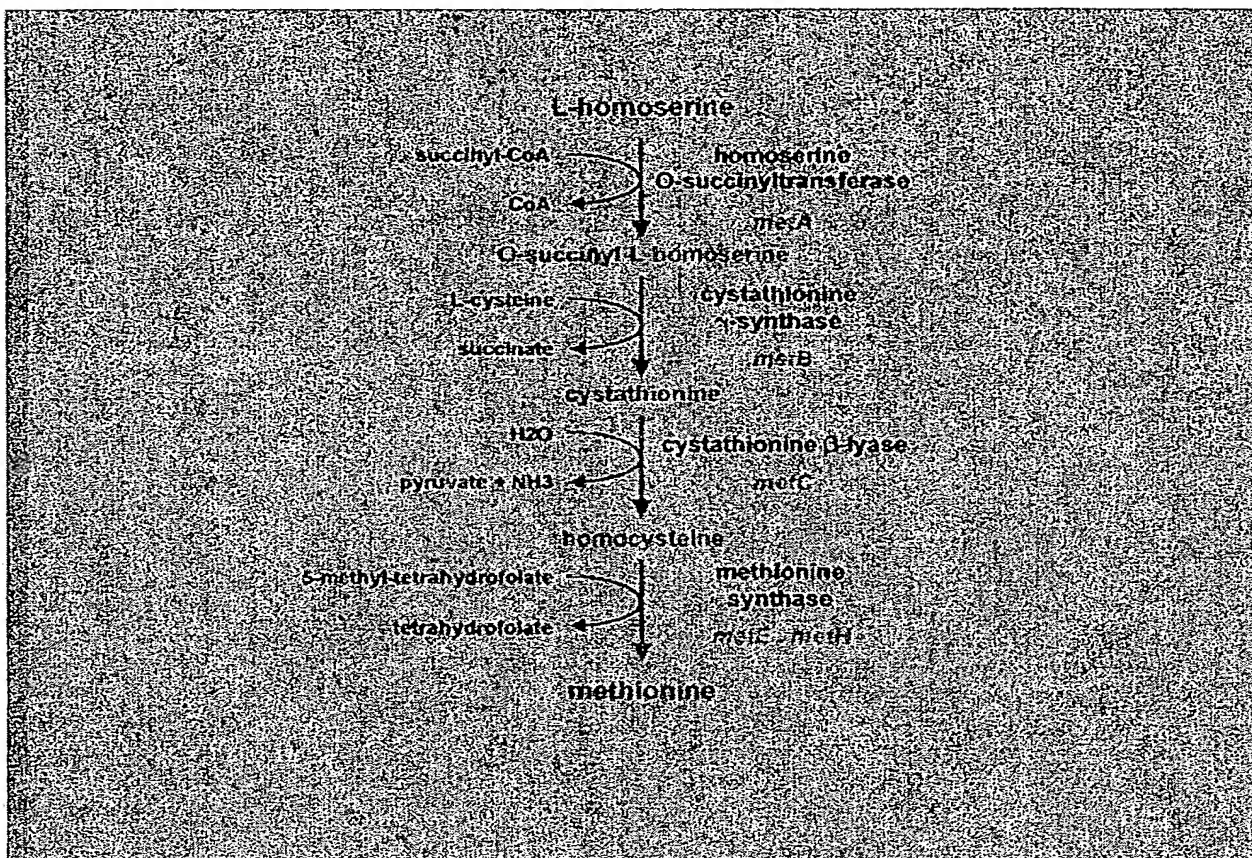


Figure 1

2 / 6

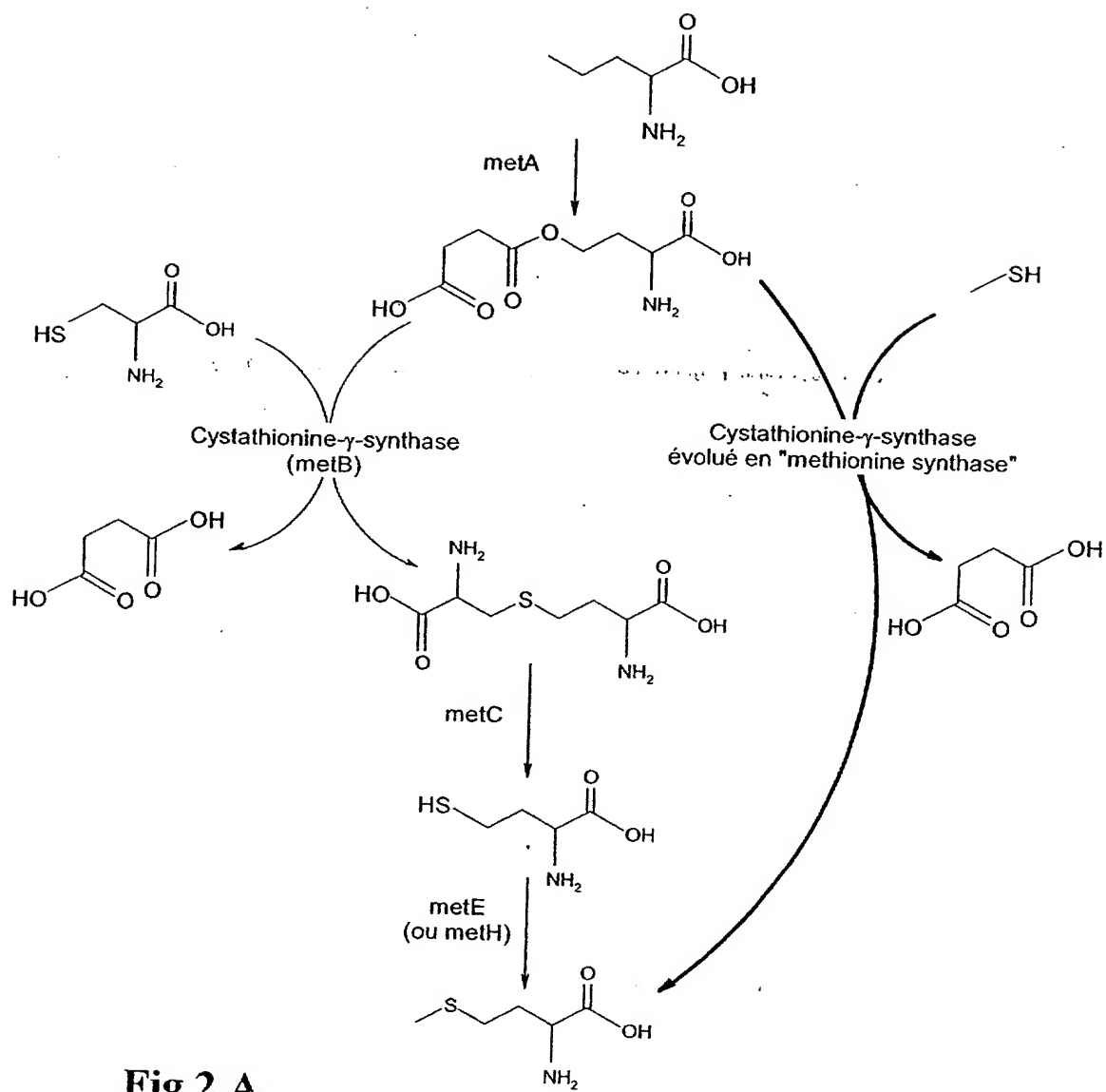


Fig 2.A

Figure 2



3 / 6

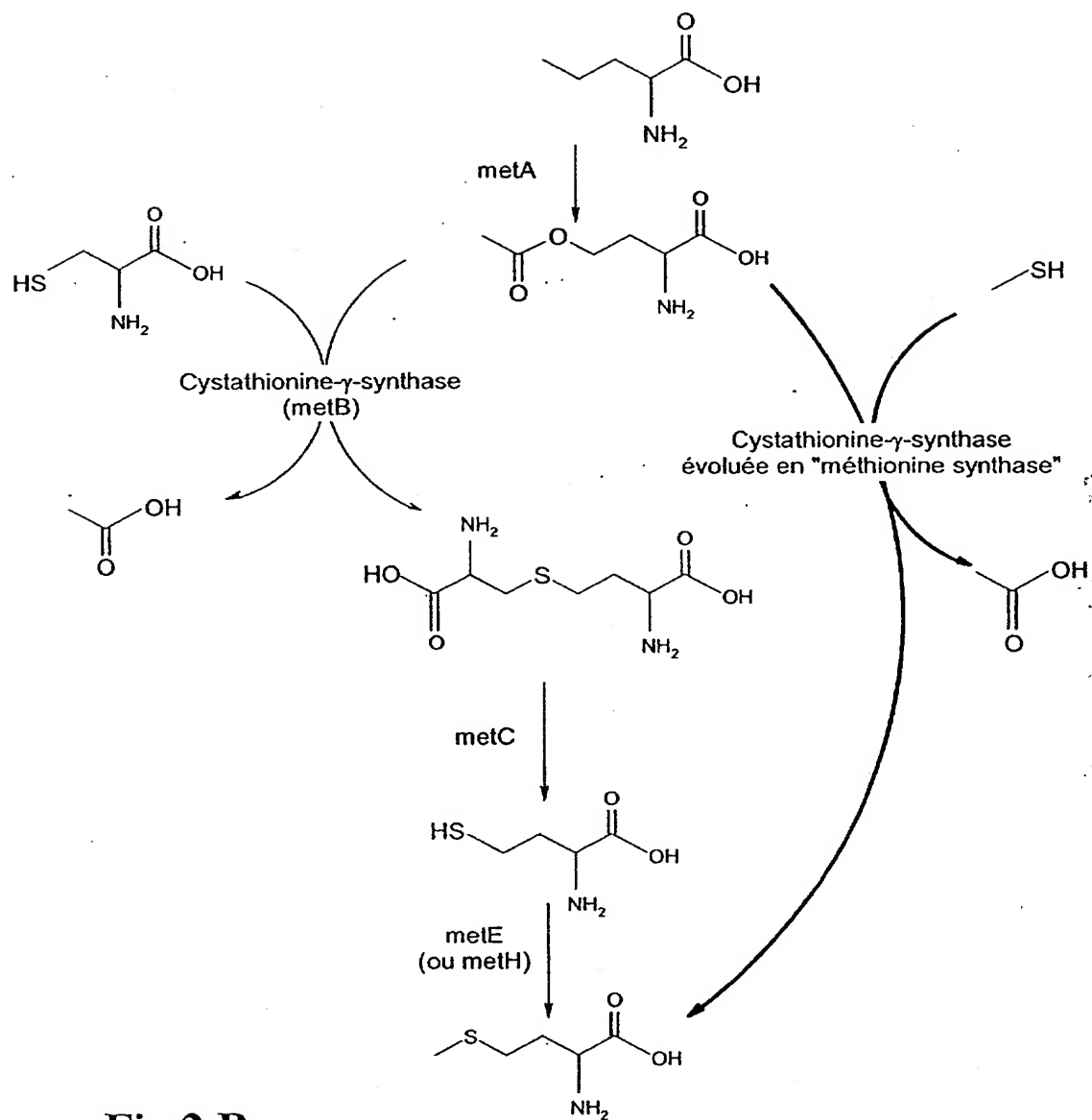


Fig 2.B

Figure 2 (suite)

4 / 6

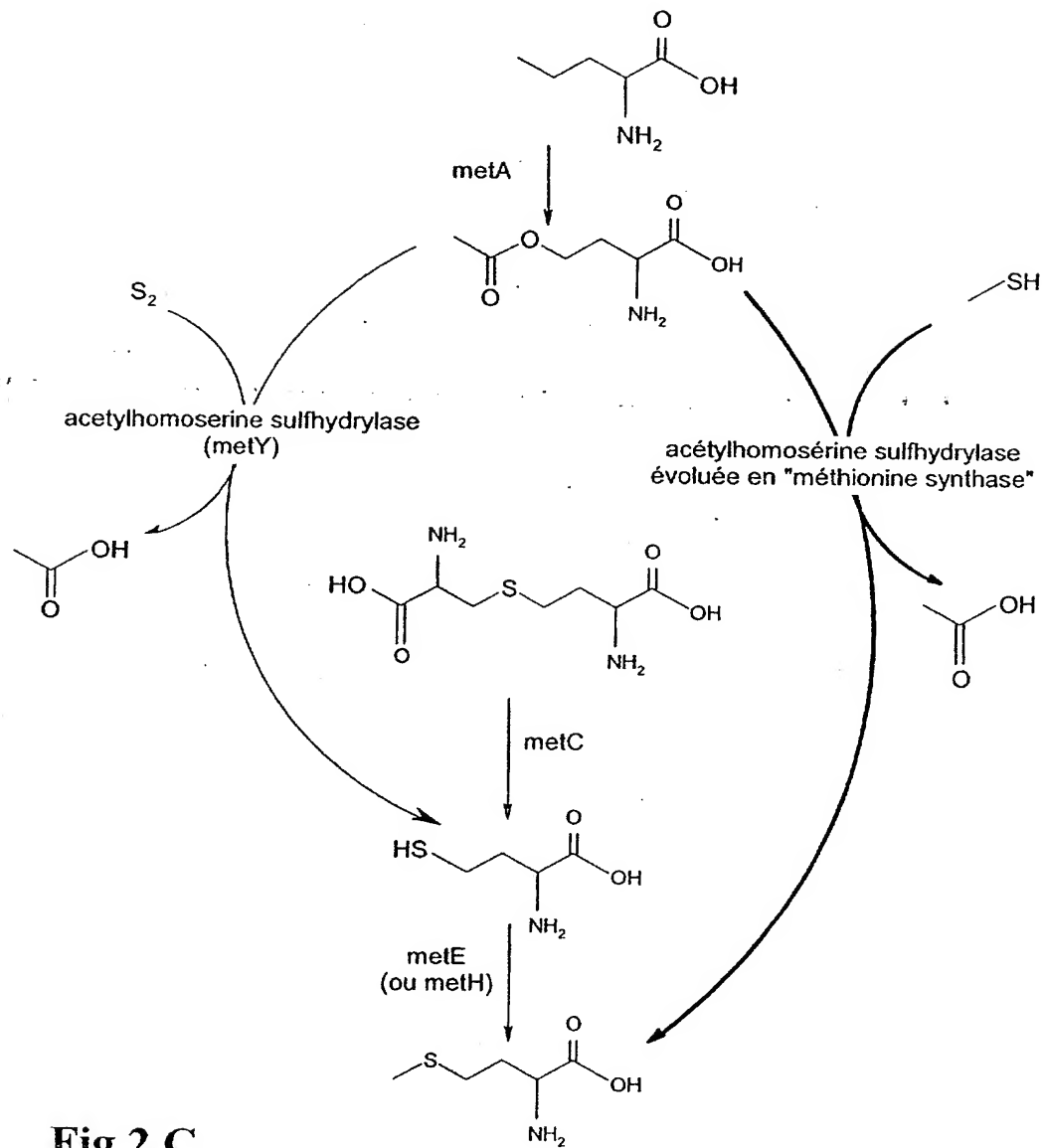


Fig 2.C

Figure 2 (suite)

5 / 6

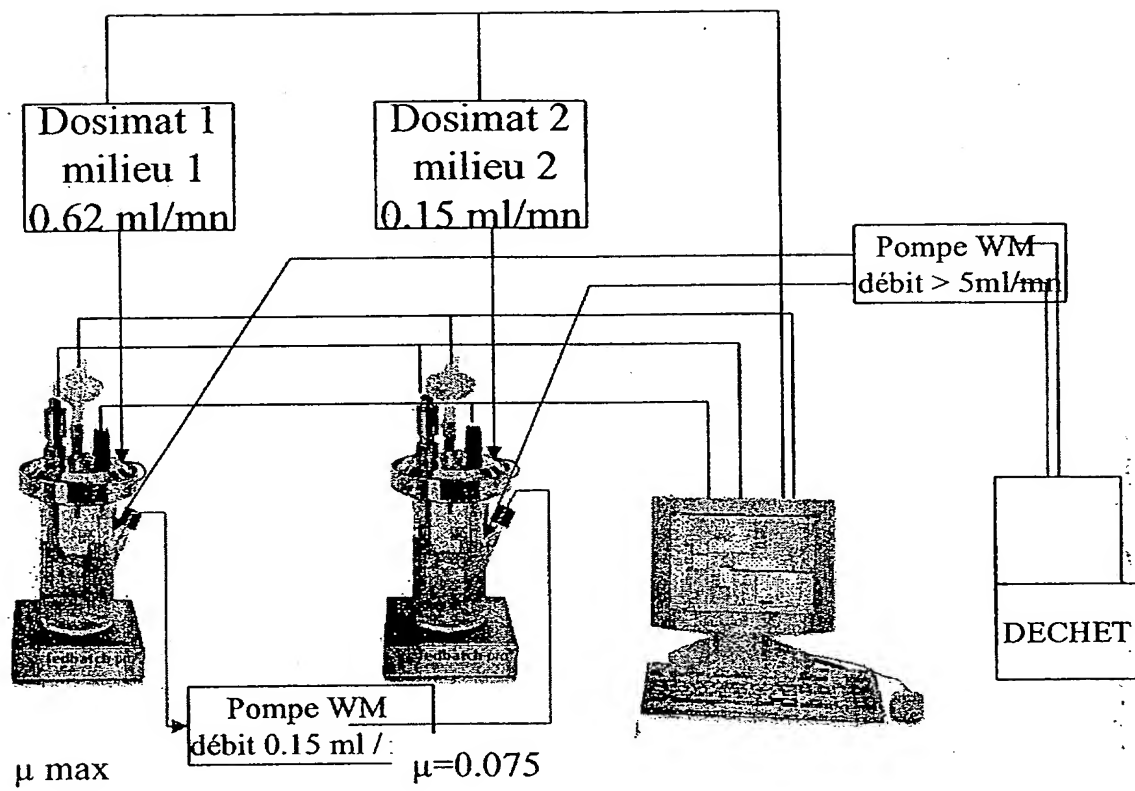


Figure 3

6 / 6

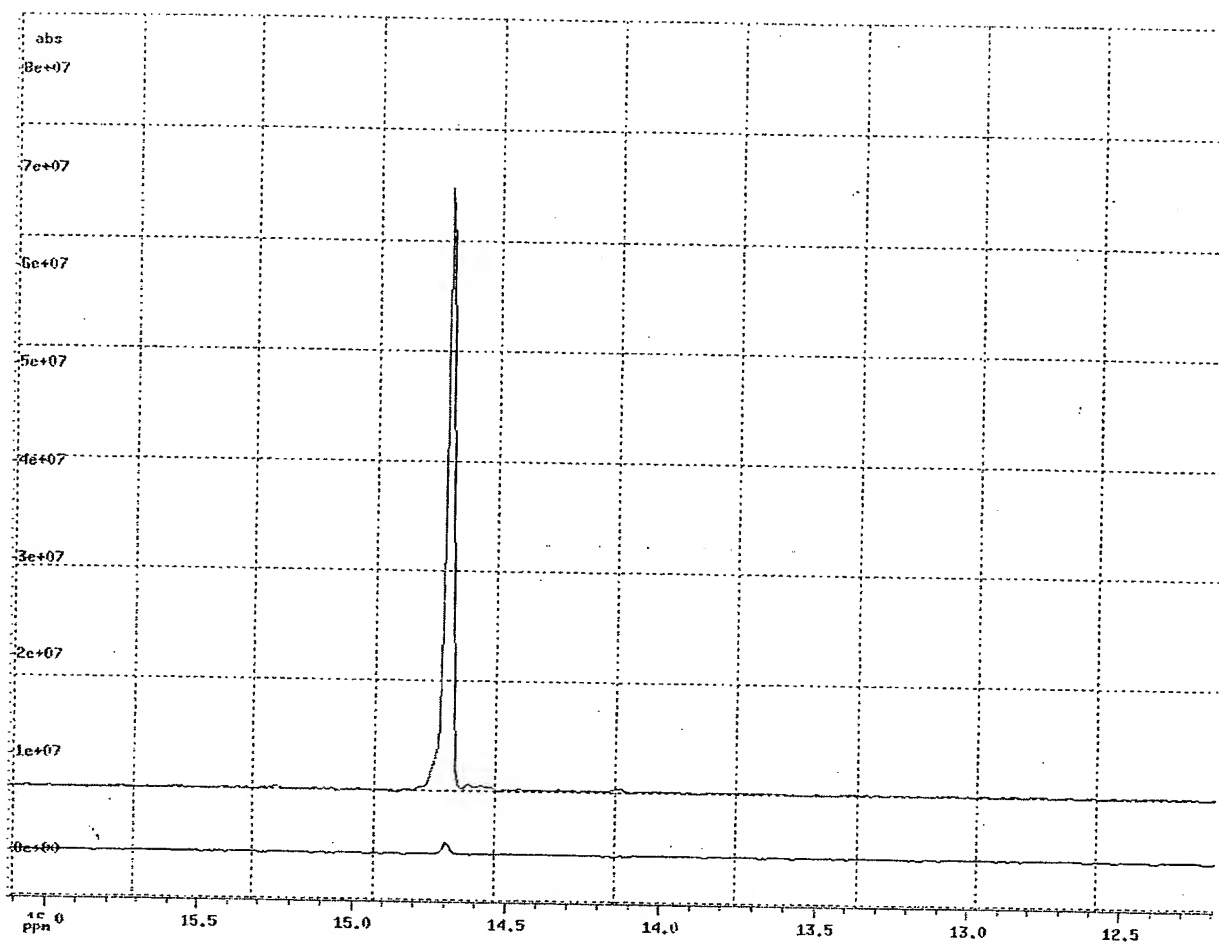


Figure 4

## LISTE DE SEQUENCE

<110> Metabolic explorer  
 <120> Procédé de criblage et d'évolution dirigée de souches produisant de la méthionine par nouvelle voie métabolique  
 <130> D20701  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle  
 <220>  
 <223> Promoteur pTAC-O  
 <400> 1  
 gagctgttga caattaatca tcggctcgta taatgtgtgg aa 42  
 <210> 2  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle  
 <220>  
 <223> Promoteur pLAC-O  
 <400> 2  
 ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tataatgtgt ggaa 44  
 <210> 3  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle  
 <220>  
 <223> Promoteur pTRC-O  
 <400> 3  
 gagctgttga caattaatca tccggctcgt ataatgtgtg gaa 43  
 <210> 4  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle  
 <220>  
 <223> Promoteur pTHLA  
 <400> 4  
 aatatattga taaaaataat aatagtgggt ataattaagt tggt 44



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° .../...  
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)		240129 D20701 FT	
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0301924	
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédé de criblage et d'évolution dirigée de souches produisant de la méthionine par nouvelle voie métabolique			
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> METABOLIC EXPLORER : BIPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE			
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b> (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		CHATEAU Michel	
Prénoms			
Adresse	Rue	Les Baumettes, Appt 47 - Bat E1	
	Code postal et ville	63200 RIOM	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GONZALEZ Benjamin	
Prénoms			
Adresse	Rue	4, rue Sidoine Apollinaire	
	Code postal et ville	63000 CLERMONT-FERRAND	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		SOUCAILLE Philippe, Noel, Paul	
Prénoms			
Adresse	Rue	Chant du Coucou	
	Code postal et ville	31450 DEYME	
Société d'appartenance (facultatif)			
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		F. Totary CPI 	